

УДК 547.458.88

## МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА И ХИТОЗАН ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГИДРОГЕЛЕЙ

© Р. Р. Вильданова<sup>1</sup>, Н. Н. Сигаева<sup>1\*</sup>, О. С. Куковинец<sup>2</sup>,  
Н. М. Власова<sup>1</sup>, С. В. Колесов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Уфимский институт химии РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября 71.

<sup>2</sup>Башкирский государственный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450017 г. Уфа, ул. Мингажева 100.

Тел.: +7 (347) 235 60 55.

Email: gip@anrb.ru

*Получены гидрогели смешением растворов периодически расщепленной гиалуроновой кислоты и сукцината хитозана в нейтральной среде при комнатной температуре. Гидрогели образуются во всем объеме раствора в течение нескольких секунд или минут в зависимости от состава смеси (концентрации, молекулярной массы сукцината хитозана, соотношения компонентов). Оптимизированы условия получения гидрогелей. Структура гидрогелей доказана спектроскопическими методами. Формирование гидрогеля обусловлено образованием как полиэлектролитного комплекса, так и ковалентных связей.*

**Ключевые слова:** гиалуроновая кислота, хитозан, гидрогель, полиэлектролитный комплекс, модификация полимеров.

### Введение

В настоящее время полимерные гидрогели, благодаря ряду уникальных механических и физико-химических свойств, применяются в фармацевтике, медицине и других отраслях. Так, использование гидрогелей в качестве лекарственной формы обеспечивает пролонгирование действия лекарственного препарата, его адресную доставку к системам и органам, а в некоторых случаях и заметный синергетический эффект действия препарата и фармакопейной основы. Как правило, полимерные гидрогели получают радикальной полимеризацией в присутствии бифункционального сшивающего агента, либо сшивкой полимеров низкомолекулярными многофункциональными сшивающими агентами. При этом большинство кросс-линкеров достаточно токсичны, что в ряде случаев их медицинского использования является недопустимым. Кроме того, введение сшивающего агента в систему полимер – лекарственное вещество может привести к изменению биологической активности лекарственного соединения в результате его химической модификации. Поэтому разработка метода получения гидрогеля без использования кросс-линкера за счет образования поперечных связей между комплементарными функциональными группами полимеров является актуальной и имеет большое практическое значение. Перспективным направлением в этом смысле представляется получение гидрогелей при совместном использовании природных полиэлектролитов, таких как гиалуроновая кислота [1] и хитозан, которые обладают высокой биосовместимостью, биологической активностью и клеточной адгезией.

Целью исследования являлась модификация гиалуроновой кислоты и хитозана и получение на их основе гидрогелей.

### Экспериментальная часть

В экспериментах использовали гиалуроновую кислоту (ГК) товарной марки «Sigma Aldrich», четыре образца хитозана (ХТЗ) товарных марок «Био-прогресс» и «Химмед», периодат натрия, янтарный ангидрид, физиологический раствор, фосфатный буфер (рН = 7.4).

Для получения периодически расщепленной гиалуроновой кислоты использовали методику [2]. Сукцинат хитозана (СХ) получали обработкой хитозана янтарным ангидридом в растворе по методике, описанной в работе [3]. Для определения степени модификации СХ использовали нингидринный анализ [4].

Спектры ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C исследуемых полимеров регистрировали на приборе «Bruker Avance III 500MHz» (внутренний стандарт – тетраметилсилан) при 20 °C в D<sub>2</sub>O. ИК-спектры образцов записывали на спектрофотометре «Shimadzu» в диапазоне 400–4000 см<sup>-1</sup>. Характеристическую вязкость водных растворов исследуемых полисахаридов измеряли при 25±0.1 °C в вискозиметре Уббелодде с висязим уровнем. Молекулярную массу полимеров определяли методом сочетания скоростной седиментации и вискозиметрии (M<sub>s[η]</sub>) или седиментационного равновесия (M<sub>z</sub>) с помощью центрифуги MOM-3180.

### Результаты и их обсуждение

Смешение растворов гиалуроновой кислоты и хитозана в нейтральной среде приводит к формированию полиэлектролитного комплекса в виде осадка (физиологический раствор) или золя (фосфатный буфер, рН = 7.4). Поэтому для получения гидрогеля (менее плотной сетки) необходимо уменьшить силу электростатических взаимодействий между полисахаридами, например, за счет модификации их функциональных групп.

Карбоксильные группы ГК являются сайтами распознавания для рецепторов и гиалуронидазы, химическая модификация по данным группам может привести к изменению биологической активности данного полисахарида [5], поэтому для ее модификации использовали периодат натрия, который окисляет гидроксильные группы (схема 1).

Реакцию окисления макромолекул ГК проводили, варьируя время проведения реакции: 2 ч (ДГК-1), 4 ч (ДГК-2) и 24 ч (ДГК-3). Так, в ИК-спектре образца ДГК-3, появляется новая полоса в области  $1725\text{ см}^{-1}$  (колебания C=O групп), характерная для альдегидов.

В соответствии с литературными данными [6] диальдегид гиалуроновой кислоты в растворе существует в форме гидрата, поэтому в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  появляются три сигнала в области 5 м.д. (рис. 1), вместо ожидаемых 9–10 м.д.

Сравнением интегральных интенсивностей сигналов гидроксильных групп гидратированной формы альдегида с сигналом метильной группы ацетамидного фрагмента в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  рассчитана степень модификации продуктов окисления.

В табл. 1 приведены некоторые характеристики ГК до и после модификации периодатом натрия (ДГК). За 24 часа окисления степень модификации ГК достигает 30%.

Небольшая скорость реакции модификации связана с инактивирующим влиянием карбоксильной группы, образующей водородную связь с гидроксильной группой C-3, что препятствует образованию комплекса с периодатом, и в значительной мере замедляет реакцию. Одновременно с окислением инициируется реакция гидролиза полисахарида, что приводит к значительному падению молекулярной массы ГК (примерно на 2 порядка).

Известно [7], что при взаимодействии соединений, содержащих альдегидные группы, с полимерами, в состав которых входят аминогруппы, воз-

можно образование гидрогелей со связями в виде основания Шиффа  $-\text{C}=\text{N}-$ . Однако при сливании растворов диальдегида гиалуроновой кислоты и водорастворимого образца хитозана ( $M_z = 35 \times 10^3$ ) при различных соотношениях в нейтральной среде образуется ПЭК в виде осадка. Вероятно, это связано с наличием большого количества аминогрупп в макромолекулах хитозана, которые взаимодействуют с карбоксильными группами ГК (конкурентная реакция).

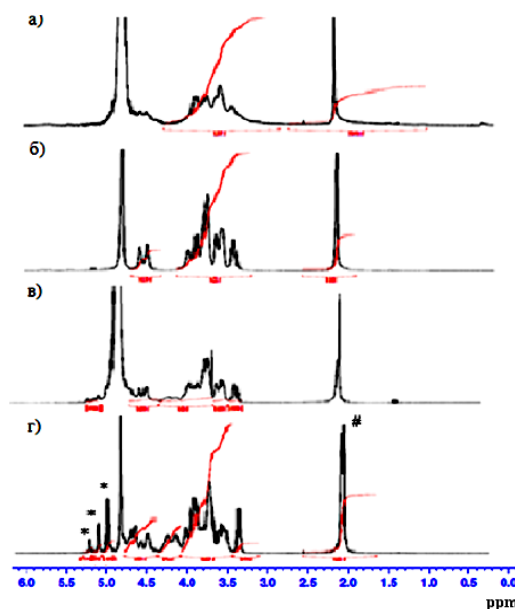


Рис. 1. Фрагменты спектров ЯМР  $^1\text{H}$  образцов ГК (а), ДГК-1 (б), ДГК-2 (в), ДГК-3 (г). Растворитель:  $\text{D}_2\text{O}$ .

Для увеличения гидрофильности (уменьшения количества звеньев, содержащих аминогруппы, в макромолекулах хитозана) и получения высокомолекулярных ( $M_w > 40 \times 10^3$ ) растворимых в воде образцов хитозана проведена модификация его макромолекул янтарным ангидридом (схема 2).

Схема 1

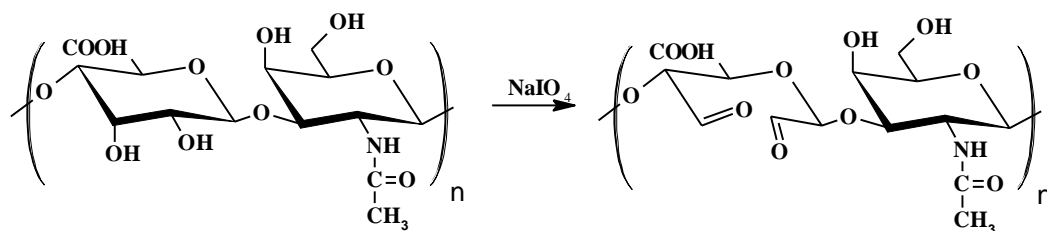
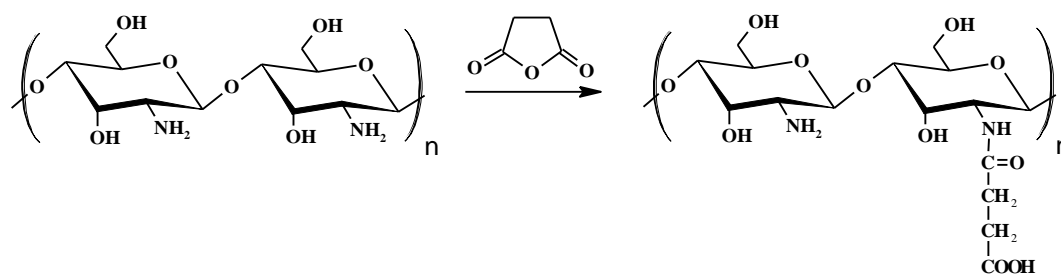


Таблица 1

Характеристики образцов гиалуроновой кислоты (ГК) и диальдегида гиалуроновой кислоты (ДГК)

Полимер	Время проведения реакции, ч	Степень модификации, %	$[\eta]$ в физ. растворе, дл/г	$M_{s[\eta]} \cdot 10^{-3}$	$M_z \cdot 10^{-3}$
ГК	–	–	21.8	1600	–
ДГК-1	2	–	5.4	190	–
ДГК-2	4	10	0.5	–	15
ДГК-3	24	30	0.2	–	14



В отличие от спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  исходного хитозана (рис. 2а), в спектре сукцината хитозана (рис. 2б) наблюдается появление набора полос в области 30–40 м.д., соответствующих углеродам метилена и нового сигнала углерода карбоксильной группы при 181 м.д., а также смещение полосы углерода карбоксильной группы  $\text{C}=\text{O}$  на 2 м.д.

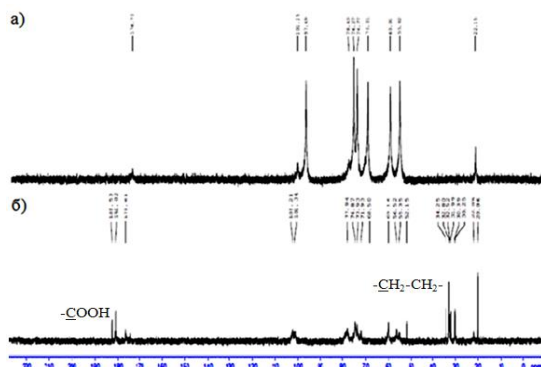


Рис. 2. Спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  ХТЗ-3 (а) в  $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ ; СХ-3 (б) в  $\text{D}_2\text{O}$ .

Исследовано влияние времени проведения реакции модификации янтарным ангидридом на степень модификации хитозана (количество ионогенных групп). Кинетика накопления функциональных групп в образцах ХТЗ приведена на рис. 3. Видно, что наиболее значительные изменения содержания карбоксильных и аминогрупп происходят за первые 10 часов проведения реакции модификации, а затем этот процесс замедляется.

Как следует из данных, приведенных в табл. 2, для получения растворимых в воде образцов хитозана степень модификации должна составлять не ме-

нее 70%, при этом вводится порядка 60% сукцинатных звеньев, непромодифицированными остаются примерно 25% аминокзвеньев.

Для установления влияния ММ сукцината хитозана на процесс формирования ПЭК и его свойства проведена модификация образцов хитозана различных молекулярных масс янтарным ангидридом в течение 24 часов (табл. 3). По-видимому, степень модификации хитозана зависит от степени деацетилирования (СД) исходного хитозана, поскольку известно, что дополнительный вклад в межмолекулярные взаимодействия вносят водородные связи, образующиеся с участием ацетамидных групп. Ацетамидные остатки создают стерические затруднения протекания реакции модификации. Кроме того, они затормаживают вращение пиранозных звеньев вокруг  $\beta$ -гликозидной связи, в результате чего повышается жесткость макромолекулы полисахарида. Поэтому значение степени модификации ХТЗ-1 (СД = 75%) отличается от значений степени модификации других образцов хитозана (СД > 80%).

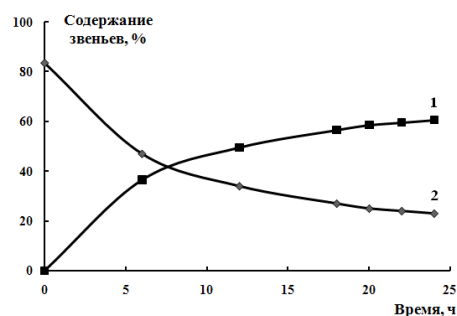


Рис. 3. Кинетические кривые накопления звеньев, содержащих карбоксильные группы (1), и расхода звеньев, содержащих аминогруппы (2).

Таблица 2

Данные по растворимости и составу хитозана до и после модификации янтарным ангидридом

Время проведения реакции, ч	Содерж. звеньев (R-NH <sub>2</sub> ), %	Содерж. звеньев (R-COOH), %	Соотнош. R-NH <sub>2</sub> : R-COOH, моль/моль	СМсх, %	Растворимость в физ. растворе
–	84	–	–	–	Нерастворим
12	34	50	1 : 1.5	60	Нерастворим
18	27	57	1 : 2.1	67	Нерастворим
20	25	59	1 : 2.3	70	Растворим
24	23	61	1 : 2.6	73	Растворим

Таблица 3

Характеристики образцов хитозана до (в числителе) и после модификации янтарным ангидридом (в знаменателе)					
Полимер до/после модификации	СД <sub>ХТЗ</sub> , %	СМ <sub>СХ</sub> , %	[η] в ацетатном буфере (рН=4.5), дл/г	M <sub>s[η]</sub> × 10 <sup>-3</sup>	M <sub>z</sub> × 10 <sup>-3</sup>
ХТЗ-1 <sup>1</sup> /СХ-1	75	55	0.7/0.5	–	35/30
ХТЗ-2 <sup>1</sup> /СХ-2	84	73	1.9/1.2	90/70	–
ХТЗ-3 <sup>1</sup> /СХ-3	82	72	3.5/1.5	–	170/120
ХТЗ-4 <sup>2</sup> /СХ-4	81	70	7.5/1.9	250/200	–

Обнаружено, что модификация ХТЗ янтарным ангидридом сопровождается небольшим уменьшением ММ по сравнению с исходными образцами, причем, в тем большей степени, чем больше ММ исходного образца. По-видимому, в ходе реакции модификации происходит незначительный разрыв β-гликозидных связей.

При смешении растворов СХ и ДГК, приготовленных в физиологическом растворе или фосфатном буфере (рН = 7.4), формируется гидрогель во всем объеме системы. Формирование гидрогеля фиксировали по наличию предела текучести (рис. 4). При этом степень модификации ДГК должна составлять порядка 30%. При увеличении содержания СХ в системе или при увеличении концентраций обоих полимеров в растворе (до 2%) время гелеобразования уменьшается вплоть до 3 с. Использование избытка ДГК или разбавленных растворов полимеров (0.1%) не приводит к формированию гидрогелей.

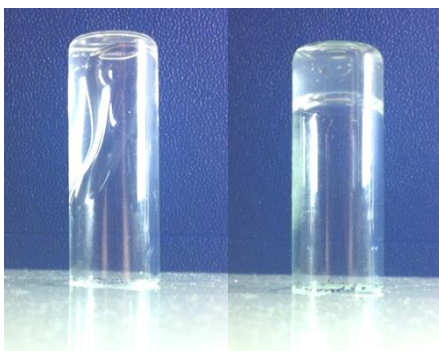


Рис. 4. Раствор до момента гелеобразования (слева) и после его достижения – гидрогель (справа).

Небольшое время формирования гидрогеля указывает на то что, по-видимому, вначале структурирование системы происходит за счет формирования полиэлектролитного комплекса, при этом параллельно протекает реакция образования ковалентных связей. Так, в ИК-спектре гидрогеля наблюдается уменьшение интенсивности поглощения полосы при 1725 см<sup>-1</sup>, принадлежащей валентным колебаниям связи –C=O в альдегидах, обнаруживается появление пика валентных колебаний –C=N–азометиновой группы (рис. 5). В спектре ЯМР <sup>13</sup>C наблюдается новый сигнал в области 167 м.д., принадлежащий углероду иминной связи (рис. 6).

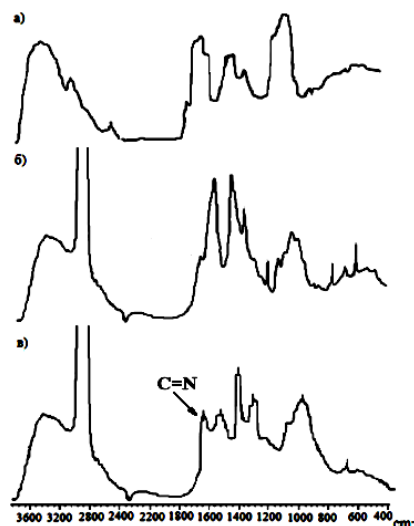


Рис. 5. ИК-спектры пленки ДГК (а), СХ в вазелиновом масле (б), лиофилизированного геля в вазелиновом масле (в).

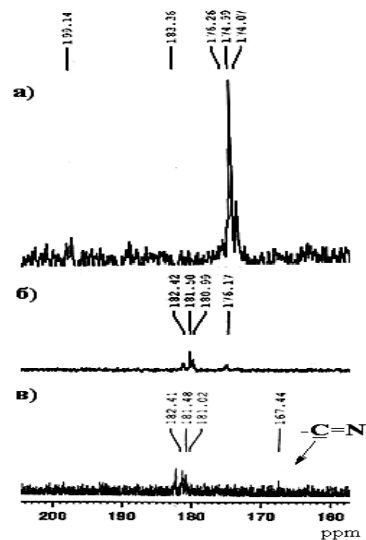
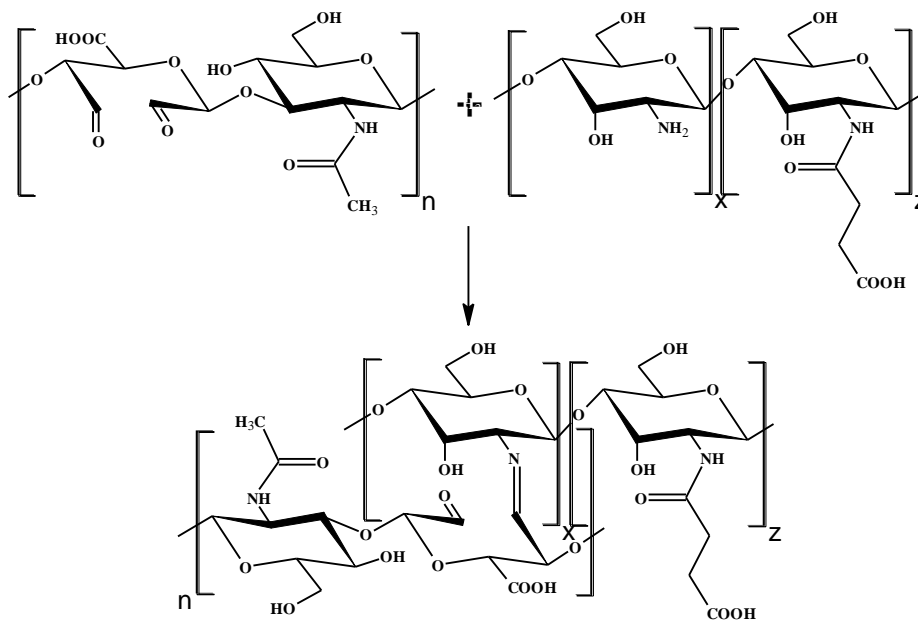


Рис. 6. Фрагмент спектра ЯМР <sup>13</sup>C гидрогеля. Растворитель: фосфатный буфер (рН = 7.4), приготовленный на основе D<sub>2</sub>O.

Таким образом, за счет взаимодействия альдегидных групп ДГК и аминогрупп СХ формируются азометиновые связи (схема 3), которые представляют собой поперечные шивки в полученных гидрогелях.

Схема 3



Использование 2–4% растворов CX-1 позволяет получить гидрогели с вязкоупругими свойствами. При увеличении концентрации или молекулярной массы CX в большей степени проявляются упругие свойства гидрогеля, видимо, за счет увеличения плотности сшивки.

### Выводы

1. Окисление гиалуроновой кислоты периодатом натрия в течение 24 ч приводит к 30% степени модификации и сопровождается значительным уменьшением молекулярной массы полимера.

2. Найдено, что при модификации хитозана янтарным ангидридом растворимые в воде образцы сукцината хитозана могут быть получены только при достижении степени модификации 70% и более.

3. Получено, что при взаимодействии диальдегида гиалуроновой кислоты и хитозана гидрогель в нейтральной среде не образуется.

4. Установлено, что при взаимодействии диальдегида гиалуроновой кислоты и сукцината хитозана формируется гидрогель в нейтральной среде (физиологическом растворе или фосфатном буфере, pH = 7.4) при комнатной температуре.

5. Формирование гидрогеля происходит за счет образования как полиэлектролитного комплекса, так и ковалентных связей.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Сигаева Н. Н., Колесов С. В., Назаров П. В., Вильданова Р. Р. Химическая модификация гиалуроновой кислоты и ее применение в медицине // Вестник Башкирского университета. 2012. Т. 17. №3. С. 1220–1241.
2. Patenaude M., Hoare T. Injectable, Mixed Natural-Synthetic Polymer Hydrogels with Modular Properties // Biomacromolecules. 2012. Vol. 13. №2. Pp. 369–378.
3. Sun S., Wang A. Adsorption properties of N-succinyl-chitosan and cross-linked N-succinyl-chitosan resin with Pb(II) as template ions // Sep Purif Technol. 2006. Vol. 51. Pp. 409–415.
4. Немцев С. В., Быкова В. М., Ежова Е. А., Лопатин С. А. Современные методы определения содержания хитозана в пищевых продуктах и препаратах на его основе // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: VIII Международ. конф. М.: ВНИРО, 2006. С. 109–114.
5. Хабаров В. Н., Бойков П. Я., Селянин М. А. Гиалуроновая кислота: получение, свойства, применение в биологии и медицине. М.: Практическая медицина, 2012. 224 с.
6. Dahlmann J., Krause A., Moller L., Kensah G., Mowes M., Diekmann A., Martin U. Fully defined in situ cross-linkable alginate and hyaluronic acid hydrogels for myocardial tissue engineering // Biomaterials. 2013. Vol. 34. №4. Pp. 940–951.
7. Кильдеева Н. Р., Перминов П. А., Владимиров Л. В., Новиков В. В., Михайлов С. Н. О механизме реакции глутарового альдегида с хитозаном // Биоорганическая химия. 2009. Т. 35. С. 397–407.

Поступила в редакцию 07.03.2016 г.

## MODIFIED HYALURONIC ACID AND CHITOSAN FOR PRODUCTION OF HYDROGELS

© R. R. Vildanova<sup>1</sup>, N. N. Sigaeva<sup>1\*</sup>, O. S. Kukovinets<sup>2</sup>, N. M. Vlasova<sup>1</sup>, S. V. Kolesov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Ufa Institute of Chemistry, RAS  
71 Otyabrya Ave., 450054, Ufa Republic of Bashkortostan, Russia.*

<sup>2</sup>*Bashkir State University  
100 Mingazhev St., 450017 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

*Phone: +7 (347) 235 60 55.*

*\*Email: gip@anrb.ru*

Development of hydrogel producing method without use of cross-linkers owing to cross links formation between complimentary polymers functional groups is relevant and has big practical significance. Challenging trend in that sense is production of hydrogels by combined use of natural polyelectrolytes, such as hyaluronic acid and chitosan, which characterized by high biocompatibility, biological activity and cellular adhesion. The purpose of the study was modification of hyaluronic acid and chitosan and production of hydrogels on their base. Mixing of hyaluronic acid and chitosan solutions is leading to formation of polyelectrolyte complex in the form of sediment (physiological solution) or sol (phosphate saline, pH = 7.4). Therefore, for hydrogel production (less compact network) it is necessary to reduce electrostatic repulsion force between polysaccharides, for example, by modification of its functional groups. Hyaluronic acid was oxidized by sodium periodate. Molecular mass of hyaluronic acid was lowered from  $1600 \times 10^3$  to  $14 \times 10^3$ . Mixing of oxidized hyaluronic acid and chitosan solutions did not lead to hydrogel formation. Chitosan was modified by succinic anhydride. Hydrogels were produced by mixing solutions of oxidized hyaluronic acid and succinate chitosan in neutral medium at room temperature. Hydrogels were formed in a solution volume for some seconds or minutes depending on mix proportion (concentrations, molecular mass of succinate chitosan, component ratios). Hydrogel receiving conditions were optimized. Hydrogel structure was proven by spectroscopic methods. Hydrogel formation is caused by polyelectrolyte complex and covalent cross-links as Schiff base  $-C=N-$ . Varying concentrations and molecular masses of succinate chitosan is leading to varying hydrogel properties: from viscoelastic to elastic.

**Keywords:** *hyaluronic acid, chitosan, hydrogel, polyelectrolyte complex, polymer modification.*

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at [bulletin\\_bsu@mail.ru](mailto:bulletin_bsu@mail.ru) if you need translation of the article.

## REFERENCES

1. Sigaeva N. N., Kolesov S. V., Nazarov P. V., Vil'danova R. R. Vestnik Bashkirskogo universiteta. 2012. Vol. 17. No. 3. Pp. 1220–1241.
2. Patenaude M., Hoare T. Biomacromolecules. 2012. Vol. 13. No. 2. Pp. 369–378.
3. Sun S., Wang A. Sep Purif Technol. 2006. Vol. 51. Pp. 409–415.
4. Nemtsev S. V., Bykova V. M., Ezhova E. A., Lopatin S. A. Sovremennye perspektivy v issledovanii khitina i khitozana: VIII Mezhdunarod. konf. Moscow: VNIRO, 2006. Pp. 109–114.
5. Khabarov V. N., Boikov P. Ya., Selyanin M. A. Gialuronovaya kislota: poluchenie, svoistva, primeneniye v biologii i meditsine [Hyaluronic acid: production, properties, application in biology and medicine]. Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2012.
6. Dahlmann J., Krause A., Moller L., Kensah G., Mowes M., Diekmann A., Martin U. Biomaterials. 2013. Vol. 34. No. 4. Pp. 940–951.
7. Kil'deeva N. R., Perminov P. A., Vladimirov L. V., Novikov V. V., Mikhailov S. N. Bioorganicheskaya khimiya. 2009. Vol. 35. Pp. 397–407.

*Received 07.03.2016.*